

# CAPITULO VI

## DETERMINACION DEL ANTAGONISMO DEL AISLAMIENTO T 95 DE *Trichoderma harzianum* SOBRE *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum* EN PLANTAS DE PEPINO COHOMBRO.

Fernando Borda<sup>1</sup> y Germán Arbeláez<sup>2</sup>

### INTRODUCCION

Una de las enfermedades de mayor importancia económica en el cultivo de clavel en Colombia es la ocasionada por el hongo *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*. Las altas pérdidas directas que ocasiona el patógeno una vez establecido en cultivos comerciales, la facilidad de propagación a través de esquejes infectados, la fácil diseminación del patógeno a través de diferentes formas, la alta persistencia del patógeno en el suelo y el alto costo y regular eficiencia de las medidas de control utilizadas, dan a esta enfermedad una gran importancia patológica y económica (Arbeláez, 1987).

Para el control del marchitamiento vascular del clavel, se realizan prácticas, tales como tratamiento del suelo con vapor de agua, con diversos fumigantes y con fungicidas sistémicos, pero el costo de dichas prácticas puede variar actualmente entre \$500.000 y \$10.000.000, lo cual depende del tipo de tratamiento (Baker, 1980; Arbeláez, 1989).

Las dificultades encontradas en el manejo de las poblaciones de *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* en el suelo por métodos convencionales, hacen que el control biológico sea uno de los métodos más promisorios para el control de la enfermedad; además el control biológico puede combinarse con otros métodos de control y así, se logra una mayor eficiencia (Scher y Baker, 1980).

El control biológico, mediante el uso de algunos hongos y bacterias antagonistas, ha sido una de las estrategias de mayor potencial para el control de enfermedades ocasionadas por patógenos del suelo (Cook y Baker, 1983).

Varios investigadores han encontrado a diversas especies de *Trichoderma* como antagonistas muy eficientes de diversas especies de hongos

fitopatógenos, tales como *Fusarium oxysporum* (Dennis y Webster, 1971; Marois y Mitchell, 1981), *Rhizoctonia solani* (Hadar et al, 1979; Chet y Baker, 1981; Chet et al, 1981), *Sclerotium rolfsii* (Elad et al, 1981) y *Sclerotinia sclerotiorum* (Ghafter, 1986; Delgado y Arbeláez, 1990).

Algunas especies del género *Trichoderma* son muy comunes en diversos suelos, principalmente en suelos ácidos y ricos en materia orgánica. Estas especies son fáciles de aislar, de cultivar y de propagar en diversos sustratos y, además, la mayoría de las especies tienen un buen micoparasitismo, compiten eficientemente por espacio y nutrientes y tienen un sistema de enzimas capaz de atacar un buen número de fitopatógenos (Wells, 1986; Chet, 1987).

La especie *Trichoderma harzianum* ha sido, hasta el momento, el hongo antagonista más utilizado en el control de enfermedades de las plantas. Además, de dicha especie, se han obtenido nuevos biotipos tolerantes a fungicidas y que tienen una mayor habilidad antagonista que los aislamientos originales (Upadhyay y Rail, 1986; Wells, 1986).

Los costos del control biológico pueden resultar menores y de mayor eficiencia, respecto al uso de otras prácticas de control tradicionales, pues, aunque los antagonistas pueden actuar en forma más lenta y en menor escala, su acción puede ser más estable y duradera que el control químico; en este caso, el efecto es temporal y se requieren aplicaciones continuas para lograr una protección adecuada de las plantas.

El control biológico no presenta algunos de los efectos negativos en la planta y en el ambiente que presenta el control químico, tales como su pérdida por resistencia de los hongos a los fungicidas, principalmente a los fungicidas sistémicos, o por revocatoria de registro, por los riesgos toxicológicos de dichos productos, por contaminación de los alimentos y del suelo y por su persistencia en el agua (Lumsden y Papavizas, 1988; Baker y Dunn, 1990; Boland, 1990).

Sin embargo, el control biológico tiene una serie de restricciones, limitaciones y requerimientos que

<sup>1</sup> Ingeniero Agrónomo, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, A.A. 14490, Santafé de Bogotá D.C.

<sup>2</sup> Profesor Titular, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, A.A. 14490, Santafé de Bogotá D.C.

deben conocerse; los organismos de control son mucho mas sensibles a las condiciones ambientales que los productos químicos, tienen algunas limitaciones ecológicas, como su inactivación en el suelo por competencia con otros organismos o por efecto de sustancias químicas, como antibióticos o pesticidas, y que, para su uso correcto, requieren de muy buen conocimiento de su biología, su ecología y su mecanismo de acción sobre los organismos que controlan (Lumsdem y Papavizas, 1988; Boland, 1990).

La especie *Fusarium oxysporum* tiene un gran número de formas especiales caracterizadas por causar marchitamientos vasculares en diferentes tipos de plantas, muchas de ellas de importancia agrícola, hortícola y ornamental. Las características de la enfermedad, la biología del patógeno y los métodos de control son bastante similares en los diferentes tipos de plantas (MacHardy y Beckman, 1981; Armstrong y Armstrong, 1981). Por lo tanto, el uso de un sistema que permita probar la eficacia de un antagonista en el control de marchitamientos vasculares ocasionados por *Fusarium oxysporum* en determinado tipo de planta, puede ser aplicable a la misma enfermedad en otras plantas.

Los objetivos de este trabajo fueron:

1. Determinar el antagonismo *in vitro* del aislamiento T 95 de *Trichoderma harzianum* sobre *Fusarium oxysporum*.
2. Determinar, en plantas de pepino cohombro, la eficacia del aislamiento T 95 de *Trichoderma harzianum* en el control de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum*.
3. Determinar, en plantas de pepino cohombro, el efecto de diferentes densidades de inóculo del aislamiento T 95 de *Trichoderma harzianum* al interactuar con diferentes densidades de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum* en el suelo.
4. Determinar, bajo condiciones controladas, la potencialidad de establecer un sistema o modelo que permita probar la eficiencia de organismos antagonistas en el control de algunas enfermedades ocasionadas por algunas formas especiales de *Fusarium oxysporum*.

## MATERIALES Y METODOS

Las pruebas se realizaron en los laboratorios de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Colombia en Bogotá. Como organismo antagonista, se utilizó el aislamiento T 95 de *Trichoderma*

*harzianum*, suministrado por el profesor Ralph Baker de la Universidad Estatal de Colorado, Fort Collins, Estados Unidos. Dicho aislamiento fué obtenido originalmente de un suelo de la Sabana de Bogotá, naturalmente supresivo a *Rhizoctonia solani*, y mediante mutación química se hizo tolerante hasta 100 ppm del fungicida Benomil (Chet y Baker 1981). Este aislamiento se clasificó inicialmente como *Trichoderma hamatum*, pero posteriormente se clasificó como *Trichoderma harzianum*.

El aislamiento de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum* se obtuvo de plantas de pepino cohombro afectadas por el marchitamiento vascular en la región de Fusagasugá, Cundinamarca. Además se obtuvieron aislamientos de *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* de plantas de clavel afectadas de varios cultivos de la Sabana de Bogotá.

El medio cultivo selectivo desarrollado por Elad *et al* (1981) se utilizó para el aislamiento de *Trichoderma harzianum* y para la determinación de la población del hongo en el suelo; el medio Extracto de levadura-extracto de malta-agar se usó para la propagación del antagonista.

El medio de cultivo Papa dextrosa agar (PDA) se utilizó para los aislamientos del patógeno y para su conservación. El medio de cultivo desarrollado por Komada (1975) se utilizó para determinar la densidad de población del *Fusarium oxysporum* en el suelo y para realizar los aislamientos de tejidos afectados en las pruebas de patogenicidad.

Las pruebas de antagonismo *in vitro* se realizaron en cajas de Petri con el medio agar agua acidificado; sobre la superficie del medio, se colocó un disco de papel celofán estéril, y en los extremos de la caja de Petri, se situaron discos de agar de 5 mm de diámetro, con el micelio del patógeno y del antagonista. Las cajas de Petri se incubaron a 28°C y, cuando los microorganismos interactuaron y colonizaron los discos de papel celofán, se retiraron para su observación bajo el microscopio. Como patógeno en estas pruebas, se utilizaron aislamientos de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum* y *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*.

Para las pruebas de eficiencia del antagonismo de *Trichoderma harzianum* en el suelo, éste se incrementó en un medio compuesto por salvado de trigo, turba y agua, en proporción de 1:1:2. Noventa gramos de este sustrato se colocaron en erlenmeyers de 1000 ml. y se esterilizaron en el autoclave a 121°C por una hora, durante 2 días consecutivos. Después de la inoculación con el micelio del hongo, los erlenmeyers se incubaron por 2 semanas a 28°C y luego, el inóculo se dejó secar al aire y se almacenó en recipientes plásticos cubiertos.

La preparación del inóculo de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum* para aplicación al suelo, se realizó en erlenmeyers de 1000 ml., donde se colocaron granos de avena enteros, previamente embebidos en agua destilada por 2 horas; el exceso de agua se decantó y el material se esterilizó a 121°C por 1 hora, por 2 días consecutivos; este sustrato se inculó con micelio del hongo y se incubó a 28°C durante 4 semanas, hasta cuando el hongo colonizó completamente los granos; luego, se dejó secar al aire, se trituró y se tamizó utilizando una malla de 1 mm.

La inoculación del patógeno y el antagonista se realizó en un suelo de textura franco-limosa, pH 5,5 y 24 % de materia orgánica. El suelo se dejó secar al aire, se trituró y se tamizó en una malla de 4 mm y luego, se esterilizó en el autoclave por una hora, durante tres días consecutivos y se almacenó en recipientes plásticos cubiertos.

El suelo esterilizado se mezcló con el inóculo de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum* en proporciones de 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 y 4,0 % por peso. La adición de *Trichoderma harzianum* al suelo se realizó a partir del inóculo preparado en proporciones de 0,16; 0,3; 0,7 y 1,0 % por peso. La mezcla de suelo con el patógeno y con el antagonista se humedeció e incubó a 27°C durante una semana en materos plásticos.

La siembra se realizó utilizando 6 semillas de pepino cohombro variedad "Straigh Eight" por matero; cuando ocurrió la emergencia de las plántulas, se eliminó la menos vigorosa y se dejaron 5 plántulas por matero. Las plantas se mantuvieron en el laboratorio a una temperatura entre 22 y 30°C, bajo luz fluorescente continua (5.000 lux). El riego se realizó diariamente con una solución nutritiva compuesta por 115 g de KNO<sub>3</sub>, 55 g de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 7 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 g de Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O y 0,15 g de ZnSO<sub>4</sub>; estas sales se disolvieron en 1 litro de agua destilada. Para lograr un buen desarrollo de las plantas y predisponerlas a la infección por el patógeno, de la solución concentrada se hizo una dilución en 100 litros de agua y se aplicó con el riego.

Cuando las plántulas comenzaron a desarrollarse, se hicieron observaciones diarias sobre la época de aparición de los primeros síntomas de la enfermedad, sobre la evolución de los síntomas y sobre el número de plantas enfermas. Además, utilizando los medios selectivos para cada especie, se cuantificaron las poblaciones de *Fusarium oxysporum* y de *Trichoderma harzianum* en el suelo.

Para las pruebas mencionadas, se utilizaron los siguientes tratamientos:

1. Suelo inoculado con *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum* en dosis de 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 y 4,0 % por peso.
2. Suelo inoculado con *Trichoderma harzianum* en las dosis de 0,16; 0,3; 0,7; 1,0; 2,0 y 3,0 % por peso.
3. Suelo inoculado con *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum* en dosis de 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 y 4,0 % por peso y *Trichoderma harzianum* en las dosis de 0,16; 0,3; 0,7; 1,0; 2,0 y 3,0 % por peso.
4. Suelo inoculado con *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum* en las dosis de 0,5; 1,0; 2,0 y 3,0 % por peso y *Trichoderma harzianum* en las dosis de 2,0 % por peso mas 30 ppm del fungicida Benomil.
5. Testigo en donde se usó suelo estéril sin ninguna inoculación.

## RESULTADOS

### Pruebas de Antagonismo *in vitro*.

En las pruebas de antagonismo *in vitro*, se observó que, a medida que la hifa de *Trichoderma harzianum* fué creciendo, formó ramificaciones y se dirigió hacia el micelio de *Fusarium oxysporum*; en un término de 30 horas, al entrar en contacto los micelios de los dos organismos, se entremezclaron de una manera compatible. En algunos sectores de la caja de Petri, al cabo de 3,5 días, o después del contacto entre los dos organismos, se observó una esporulación escasa de ambos hongos y no se observó inhibición del crecimiento de las colonias.

Los resultados fueron idénticos para la interacción entre el antagonista *Trichoderma harzianum* y el patógeno bien fuera *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum* o *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*.

### Incidencia de la Enfermedad.

Según las dosis utilizadas, la inoculación del patógeno *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum* al suelo, en todas las dosis empleadas, ocasionó enfermedad en plantas de pepino cohombro en distintas proporciones.

Las dosis de inóculo de 0,5 % del patógeno ocasionó el 60 % de marchitamiento de las plantas, la dosis de 1,0 % causó el marchitamiento del 90 % de las plantas, mientras que las dosis de 3,0 y 4,0 % ocasionaron el marchitamiento de todas las plantas.

En las dos dosis más altas de inóculo del patógeno (3,0 y 4,0 %), los primeros síntomas de la enferme-

dad se presentaron a los 13 días después de la siembra y consistieron en el amarillamiento de una de las hojas cotiledonares, seguido por el marchitamiento de la planta y, finalmente, la muerte hacia los 25 días.

En los tratamientos en donde se presentó la interacción del antagonista en dosis de 0,16 % y del patógeno en dosis de 3,0 y 4,0 %, se observó, 25 días después de la siembra, una disminución del 15 y 10 % de plantas marchitas, respectivamente, en comparación con los tratamientos en donde se aplicó el patógeno a las mismas dosis, pero sin el antagonista. Cuando la dosis del antagonista fué del 1,0 % y la dosis del patógeno fué de 3,0 y 4,0 %, la reducción de la enfermedad fué del 43 y 52 %, respectivamente (Figura 6.1). Además de la disminución en el número de plantas enfermas, se observó, por acción del antagonista, un retardo en la aparición de los síntomas.

En los tratamientos con una dosis del 2,0 % de *Fusarium oxysporum* y de 1,0 y 0,7 % de *Trichoderma harzianum*, la reducción en el número de plantas enfermas fué de 8 y 2 %, respectivamente, en comparación con el testigo tratado únicamente con el patógeno (Figura 6.1).

El menor porcentaje de plantas enfermas se observó cuando *Trichoderma harzianum* se aplicó en dosis de 1,0 % en combinación con cualquiera de las dosis del patógeno, presentándose entre el 47 y 57 % de plantas con marchitamiento vascular (Figura 6.1).

En los tratamientos en donde se realizó la aplicación de *Trichoderma harzianum* combinado con 30 ppm del fungicida Benomil, se observó un control de la enfermedad semejante al logrado cuando se aplicó solo el antagonista, excepto cuando la dosis del patógeno fué del 3 %, en donde el número de plantas enfermas fué aún mayor (Figura 6.2).

### Población de *Trichoderma harzianum* en el Suelo.

La población del antagonista, después de la inoculación al suelo, aumentó, a los 27 días después de iniciado el experimento, aproximadamente en un 70 %, en todos aquellos tratamientos en donde el patógeno no estuvo presente.

La interacción entre los 2 organismos en el suelo, en las dosis altas utilizadas, produjo un crecimiento micelial abundante y una mayor producción de esporas de *Trichoderma harzianum*, en comparación con la observada cuando el antagonista se desarrolló solo en el suelo en presencia de plantas sanas.

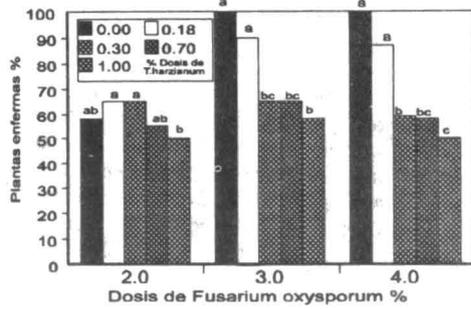


Figura 6.1. Efecto de las diferentes dosis de *Trichoderma harzianum* y *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum* sobre el marchitamiento vascular del pepino cohombro, 27 días después de la inoculación al suelo. Los tratamientos seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo a la Prueba de Rango Múltiple de Duncan ( $p = 0.05$ ). Promedio de 3 replicaciones.

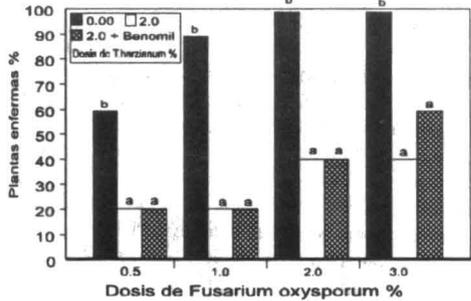


Figura 6.2. Efecto de *Trichoderma harzianum* y el fungicida Benomil sobre el marchitamiento vascular del pepino cohombro, 20 días después de la inoculación al suelo. Los tratamientos seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo a la Prueba de Rango Múltiple de Duncan ( $p = 0.05$ ). Promedio de 4 replicaciones.

### Población de *Fusarium oxysporum* en el Suelo.

El aumento de la población del patógeno en el suelo en ausencia de *Trichoderma harzianum* fué del 90 %, con respecto a la densidad inicial aplicada. Cuando el patógeno se aplicó en la dosis de 4 %, que fué la dosis más alta empleada y el antagonista se aplicó en las dosis de 0,16 y 0,30 %, la población del patógeno aumentó apenas en un 40 %.

Cuando el patógeno se aplicó al suelo en las dosis de 3,0 y 4,0 % y el antagonista se inoculó en dosis

de 0,7 y 1,0 %, la población del patógeno disminuyó hasta en un 55 %, con relación a la densidad inicial aplicada al suelo; en estos casos, se presentaron los menores porcentajes de la enfermedad.

### **Efecto de *Trichoderma harzianum* en el Crecimiento de las Plantas.**

Veinticinco días después de la siembra, se observó, en los tratamientos en donde el suelo se inoculó con *Trichoderma harzianum* en dosis de 0,7 y 1,0 %, un incremento del 35 % en la altura de las plantas (8 cm), con relación a las plantas en donde no se aplicó antagonista (5,2 cm).

Los tratamientos en donde el patógeno se inoculó al suelo en las dosis bajas no presentaron diferencias apreciables en la altura de las plantas, en comparación con las plantas Testigo que no recibieron ningún tipo de organismo. Por el contrario, cuando se realizaron inoculaciones con las dosis altas del patógeno, se obtuvieron plantas más pequeñas que las plantas Testigo.

Los tratamientos en donde se aplicó el patógeno en dosis de 3,0 y 4,0 % y el antagonista en dosis de 0,7 y 1,0 % se encontraron plantas ligeramente más altas (6 cm), en comparación con las plantas Testigo.

### **Establecimiento de un sistema para probar la eficiencia de un organismo antagonista.**

El resultado más importante de este trabajo fue haber logrado establecer, en el laboratorio, un sistema sencillo, para probar la eficiencia de diversos organismos antagonistas en el control del marchitamiento vascular del pepino cohombro ocasionado por *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum*. Bajo las condiciones experimentales, se obtuvo un período de incubación de la enfermedad muy corto, de apenas 12 a 15 días y los experimentos se terminaron con la muerte de las plantas, entre los 25 y 30 días.

### **DISCUSION**

Las pruebas *in vitro* realizadas no fueron buenas para determinar la eficiencia antagonista del aislamiento T 95 de *Trichoderma harzianum* sobre los patógenos *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum* y *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*.

Las pruebas de antagonismo, en donde el patógeno y el antagonista se aplicaron al suelo, fueron bastante efectivas para demostrar la interacción entre los dos organismos y la disminución de la enfermedad.

Este tipo de pruebas han sido muy eficientes para el estudio del antagonismo de *Pseudomonas putida* sobre *Fusarium oxysporum* en plantas de pepino cohombro, rábano y lino (Scher y Baker, 1980; 1982).

Todas las cinco dosis del patógeno utilizadas ocasionaron la enfermedad, aunque en diferentes proporciones, observándose una relación directa entre las dosis del patógeno y la incidencia de la enfermedad.

La dosis de 0,5 % de *Fusarium oxysporum*, equivalente a  $3,25 \times 10^4$  unidades formadoras de colonias por gramo de preparación seca y que ocasionó una mortalidad del 60 % de las plantas enfermas, fué bastante adecuada para medir el potencial antagonista del aislamiento T 95 de *Trichoderma harzianum* sobre el hongo *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum*. Esta densidad de inóculo, que causó una mortalidad cercana al 50 % de las plantas, es adecuada para este tipo de ensayos y evita el enmascaramiento del potencial antagonista de un aislamiento como lo recomiendan Kinderman *et al* (1983).

El antagonista *Trichoderma harzianum* fué más eficiente al interactuar con dosis altas del patógeno que con dosis bajas, logrando reducir la enfermedad del 100 % al 40 %.

El aumento de la población de *Trichoderma harzianum* al desarrollarse en forma conjunta con el patógeno en el suelo y la disminución de la población del patógeno observada, demuestran la existencia de una interacción entre los dos organismos, resultado que favorece al antagonista. La disminución del patógeno en el suelo se manifestó, además, con un retardo en la expresión de los síntomas de la enfermedad y con una menor mortalidad de las plantas.

El estímulo en el crecimiento de las plantas de pepino cohombro obtenido con la aplicación de *Trichoderma harzianum* al suelo fué similar al encontrado por Chang *et al* (1986) en plantas de pepino cohombro, pimentón, tomate, crisantemo y petunia y por Elad *et al* (1980) en plantas de frijol.

La disminución del tamaño y desarrollo de las plantas de pepino cohombro cuando se aplicaron dosis altas del patógeno fueron similares a la disminución de tamaño de las plantas de clavel por efecto de *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*, observada por Arbeláez y Calderón (1992).

El establecimiento de un sistema para determinar la capacidad antagonista de *Trichoderma harzianum* en el control del marchitamiento vascular de pepino cohombro, ocasionado por *Fusarium oxysporum*

f.sp. *cucumerinum*, se considera el mayor aporte de esta investigación. De una manera sencilla, con materos pequeños y en un laboratorio que, sin mayor adaptación, mantiene una temperatura entre 22 y 30°C bajo luz fluorescente continua, ofrece una metodología sencilla también para probar, en distintas plantas, diversos hongos y bacterias antagonistas en el control del marchitamiento vascular ocasionado por diversas formas especiales de *Fusarium oxysporum*. En ensayos preliminares, este sistema funcionó, también, en plantas de tomate, lino y rábano, pero fué mucho más eficiente en pepino cohombro, razón por la cual se escogió esta planta para el desarrollo de la investigación.

Esta metodología, por la corta duración de los experimentos, permite realizar varios ensayos en un corto tiempo a muy bajo costo, sin tener que realizar pruebas de campo que toman más tiempo y son más costosas.

En este trabajo, se comprobó que los ensayos en donde se utilizan plantas que se mantienen bajo condiciones controladas son mucho más efectivos y de mayor utilidad para el estudio de posibles antagonistas de patógenos del suelo que las pruebas *in vitro*, como lo consideran Linderman *et al* (1983).

Además, esta metodología ha sido aplicable al efecto de diferentes aislamientos de *Trichoderma* en el control de enfermedades causadas por *Rhizoctonia solani* y *Pythium* sp. (Eliás *et al*, 1989; Galindo *et al*, 1990; Rincón *et al*, 1992).

## BIBLIOGRAFIA

- Arbeláez, G. Fungal and bacterial diseases on carnation in Colombia. *Acta Horticulturae* 216: 151-157. 1987.
- Arbeláez, G. Control de las enfermedades vasculares del clavel en Colombia. *Agronomía Colombiana* 6: 3-9. 1989.
- Arbeláez, G. y O.L. Calderón. Determination of the physiological races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* on carnation in Colombia. *Acta Horticulturae* 307: 43-49. 1991.
- Armstrong, G.M. and J.K. Armstrong. Formae speciales and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases. p. 391-399. In P. E. Nelson, T. A. Toussoun and R. J. Cook (Eds.). *Fusarium: diseases, biology and taxonomy*. The Pennsylvania State University Press. University Park and London. 1981.
- Baker, R. Measures to control *Fusarium* and *Phialophora* wilts pathogens of carnation. *Plant Disease* 64: 743-749. 1980.
- Baker, R. and P. E. Dunn. Preface p. XIX - XXII In R. Baker and P. E. Dunn (Eds.). *New directions in biological control alternatives for suppressing agricultural pests and diseases*. Alan R. Liss. New York. 1990.
- Boland, G. J. Biological control of plant diseases with fungal antagonists: Challenges and opportunities. *Canadian Journal of Plant Pathology* 12: 295-299. 1990.
- Chang, Y.C., R. Baker, O. Kleifeld and I. Chet. Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. *Plant Disease* 70: 145-148. 1986.
- Chet, I., G. E. Harman and R. Baker. *Trichoderma hamatum*: its hyphal interaction with *Rhizoctonia solani* and *Pythium* spp. *Microbial Ecology* 7: 29-38. 1981.
- Chet, I. and R. Baker. Isolation and biocontrol potential of *Trichoderma hamatum* from soil naturally suppressive to *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 71: 286-290. 1981.
- Cook, R.J. and K.F. Baker. The nature and practice of biological control of plant pathogens. American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. 1983.
- Delgado, de Kallman, L. y G. Arbeláez. Control de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary en crisantemo y habichuela con diferentes aislamientos de *Trichoderma* y con fungicidas. *Agronomía Colombiana* 7: 33-39. 1990.
- Dennis, C. and J. Webster. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*. III. Hyphal interactions. *Trans. Br. Micol. Soc.* 57: 363-369. 1971.
- Elad, Y., I. Chet and J. Katan. *Trichoderma harzianum*: a biocontrol agent effective against *Sclerotium roffsii* and *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 70: 119-121. 1980.
- Elad, Y., I. Chet and Y. Henis. A selective medium improving quantitative isolation of *Trichoderma* spp. from soil. *Phytoparasitica* 9: 59-67. 1981.
- Eliás, R., O. Arcos y G. Arbeláez. Estudio del antagonismo de algunas especies de *Trichoderma* sobre *Fusarium oxysporum*, y *Rhizoctonia solani*. *Agronomía Colombiana* 6: 25-30. 1989.
- Galindo, J.R., G. Hernández y G. Arbeláez. Control biológico de tres hongos causantes de enfermedades en coliflor y pepino cohombro. *Revista ICA* 25: 149-156. 1990.
- Ghafter, A. Biological control of sclerotial disease. Vol I. p. 153-175. In K. G. Mukerji and K. L. Garg (Eds.). *Biocontrol of plant diseases*. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. 1986.
- Hadar, Y., I. Chet and Y. Henis. Biological control of *Rhizoctonia solani* damping off with wheat bran culture of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 69: 64-68. 1978.
- Komada, H. Development of a selective medium for

- quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soil. *Rev. Plant Protection Res.* 8: 114-125. 1975.
21. Linderman, R.G., L.W. Moore, K.F. Baker and D.A. Cooksey. Strategies for detecting and characterizing system for biological control of soilborne plant pathogens. *Plant Disease* 67: 1058-1064. 1983.
  22. Lumsden, R.D. and G.C. Papavizas. Biological control of soil borne plant pathogens. *American Journal of Alternative Agriculture* 3: 98-101. 1988.
  23. Marois J.J. and D.J. Mitchell. Effects of fumigation and fungal antagonist on the relationships of inoculum to infection incidence and disease severity in *Fusarium* crown rot of tomato. *Phytopathology* 71: 167-170. 1981.
  24. MacHardy, W.E. and C.H. Beckman. Vascular wilt Fusaria: infection and pathogenesis. p. 365-390. *In* P.E. Nelson, T.A. Toussoun and R.J. Cook (Eds.). *Fusarium: diseases, biology and taxonomy*. The Pennsylvania State University Press. University Park and London. 1981.
  25. Rincón, A.A., J.E. Leguizamón y G. Arbeláez. Control biológico de *Rhizoctonia solani* con *Trichoderma* en semilleros de café. *Cenicafé*. 43: 73-83. 1992.
  26. Scher, F.M. and R. Baker. Mechanisms of biological control in a *Fusarium*-suppressive soil. *Phytopathology* 70: 412-417. 1980.
  27. Scher, F.M. and R. Baker. Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to *Fusarium* wilt pathogens. *Phytopathology* 72: 1567-1573. 1982.
  28. Upadhyay, B. S. and B. Rai. Biocontrol agents of plant pathogens: their use and practical constraints. Vol I. p. 115-136. *In* K. G. Mukerji and K. L. Garg (Eds.). *Biocontrol of plant diseases*. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. 1986.
  29. Wellis, H. D. *Trichoderma* as a biocontrol agent. p. 71-82. *In* K. G. Mukerji and K. L. Garg (Eds.). *Biocontrol of plant diseases*. Vol. I. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. 1986.